

4 日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 6月 3日

27 JUL 2000

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第157111号

出願人
Applicant(s):

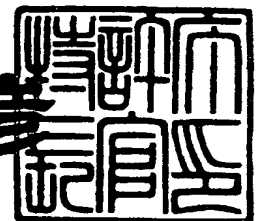
武田薬品工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3051993

【書類名】 特許願

【整理番号】 A99109

【提出日】 平成11年 6月 3日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/705
C07K 14/435

【発明の名称】 C D 1 0 0 を用いるスクリーニング方法

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府吹田市千里山東 2 丁目 1 7 番 B - 5 0 4 号

 【氏名】 菊谷 仁

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府池田市五月丘 1 丁目 8 番 3 - 2 - 6 0 4 号

 【氏名】 熊ノ郷 淳

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県西宮市郷免町 1 番 2 5 号

 【氏名】 堀 晃

【特許出願人】

 【識別番号】 000002934

 【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100073955

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

 【識別番号】 100110456

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】CD 1 0 0 を用いるスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】CD 1 0 0 またはその塩をリガンドとして用いることを特徴とする、CD 1 0 0 またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法。

【請求項 2】CD 1 0 0 またはその塩をリガンドとして用いることを特徴とする、CD 1 0 0 またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 3】受容体が CD 7 2 またはその塩である請求項 1 記載のスクリーニング法または請求項 2 記載のスクリーニング用キット。

【請求項 4】請求項 1 記載のスクリーニング法または請求項 2 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、CD 1 0 0 またはその塩と CD 7 2 またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

【請求項 5】CD 1 0 0 またはその塩の活性を促進または阻害する請求項 4 記載の化合物またはその塩。

【請求項 6】請求項 4 記載の化合物またはその塩を含有する医薬。

【請求項 7】抗体産生誘導剤または抗体異常産生に起因する疾患の予防・治療剤である請求項 6 記載の医薬。

【請求項 8】抗体異常産生に起因する疾患がアレルギーまたは自己免疫疾患である請求項 7 記載の医薬。

【請求項 9】CD 1 0 0 またはその塩、あるいは CD 1 0 0 またはその塩および試験化合物を CD 7 2 の発現細胞に添加し、発現細胞より産生もしくは分泌された抗体量の変化を測定することを特徴とする請求項 1 記載のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、CD 1 0 0 (プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc Natl Acad Sci USA) 93

巻、(1996年)11780-11785頁など) またはその塩とその受容体、たとえばCD 72 (ジャーナルオブイミュノロジー (J. Immunol) 149巻 (1992年) 880-886頁など) を用いることを特徴とする抗体産生誘導剤または抗体異常産生に起因する疾患の予防・治療剤として有用な化合物またはその塩のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

B細胞はIgM、IgD、IgG、IgA、IgEの5つの種類の抗体のいずれか1種類を出しうる。B細胞は分化に伴い、生体内で始めて出会う抗原に遭遇するとまず遺伝子の構成上、まずIgMを産生する。しかし、IgMの生理機能は他の種類の抗体に比べて弱い。同じ抗原の刺激が続くと、遺伝子に変化してIgM以外の種類の抗体が産生され強い生理機能を発揮する。この免疫グロブリンがIgMから他の種類に変わる作用、現象をクラススイッチという。

CD40はB細胞上に発現している膜糖蛋白質であり、例えば活性化したT細胞上に発現しているCD40Lと反応する。CD40がないマウスでは、抗体産生、クラススイッチ、ワクチン作用が認められないことが知られており、CD40はB細胞の抗体産生機能にとって必須の分子である。CD40でB細胞を刺激した場合、抗IgM抗体によるB細胞の死滅を抑制し、また、CD40でB細胞を刺激した場合、IgMを含む様々なクラスの抗体産生が誘導される。しかしながら、未だ何がこれらのB細胞の反応を誘導しているのかは不明である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

もし、B細胞の死滅、およびクラススイッチを制御することができれば、B細胞の抗体産生を調節することが可能になる。

抗体産生がすみやかに産生されることが要求される場合、例えばかぜ症候群、インフルエンザ等の流行性疾患に対してワクチン接種後の抗体価を速やかに上げることができれば、流行性疾患に対する有効な治療法となるが、現在までのところそのような治療法は存在しない。また、異常な抗体が産生されることによって生じる疾病、例えばアトピー性喘息、アトピー性皮膚炎、慢性間接リウマチ、

アレルギー性鼻炎に対して、異常抗体を特異的に低下させることができればこのようないわゆるアレルギー、自己免疫疾患に対する有効な治療法となるが、現在までのところそのような治療法は存在しない。

【０００４】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明者らは、ＣＤ４０によって誘導される遺伝子を分離取得し、その分子がＣＤ１００であることを解明した。さらに、ＣＤ１００がＣＤ４０、ＩＬ－４、またはＬＰＳ等の活性化因子で刺激されたＢ細胞上のＣＤ７２に結合し複合体を形成すると、抗ＩｇＭ抗体によるＢ細胞の死滅が回避でき、さらにクラススイッチの誘導に非常に重要な役割を担っていることを解明した。ＣＤ１００がＣＤ４０、ＩＬ－４、またはＬＰＳ等の活性化因子で刺激されたＢ細胞上のＣＤ７２に結合し、複合体を形成すると、Ｂ細胞はクラススイッチを引き起こし、生体内で特異的な高親和性の抗体を強力に誘導することを解明した。これらの事実はＣＤ７２とＣＤ１００との結合を誘導する物質、ＣＤ１００に置き換わりＣＤ７２に結合する物質、ＣＤ１００分子を一部改変してＣＤ７２への結合能を高めた物質、もしくはＣＤ１００そのものが、例えばかぜ症候群、インフルエンザ等の流行性疾患に対してワクチン接種後の抗体価を速やかに上げる有効な治療法となることを示している。

またＣＤ１００は癌、感染症に対する免疫賦活剤になることを示している。また、ＣＤ７２とＣＤ１００との結合を阻害するような物質は、活性化Ｂ細胞の抗体産生のみを阻害することが予想され異常な抗体が産生されることによって生じる疾病、例えばアトピー性喘息、アトピー性皮膚炎、慢性間接リウマチ、アレルギー性鼻炎に対する有効な治療法となることを示している。

【０００５】

すなわち、本発明は、

(１) ＣＤ１００またはその塩をリガンドとして用いることを特徴とする、ＣＤ１００またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法、

(２) ＣＤ１００またはその塩をリガンドとして用いることを特徴とする、ＣＤ

100またはその塩とその受容体との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(3) 受容体がCD72またはその塩である上記(1)項記載のスクリーニング法または上記(2)項記載のスクリーニング用キット、

(4) 上記(1)項記載のスクリーニング法または上記(2)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

(5) CD100またはその塩の活性を促進または阻害する上記(4)項記載の化合物またはその塩、

(6) 上記(4)項記載の化合物またはその塩を含有する医薬、

(7) 抗体産生誘導剤または抗体異常産生に起因する疾患の予防・治療剤である上記(6)項記載の医薬、

(8) 抗体異常産生に起因する疾患がアレルギーまたは自己免疫疾患である上記(7)項記載の医薬、

(9) CD100またはその塩、あるいはCD100またはその塩および試験化合物をCD72の発現細胞に添加し、発現細胞より産生もしくは分泌された抗体量の変化を測定することを特徴とする上記(1)項記載のスクリーニング法などを提供するものである。

【0006】

本発明におけるCD100に関して、具体的には、公知のCD100またはその塩〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc Natl Acad Sci USA) 93巻、(1996年)11780-11785頁；ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)271巻、(1996年)33376-33381頁〕などがあげられるのみならず、

(10) 配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド（以下、CD100と略称する）またはその塩、または

(11) ポリペプチドが、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠

失したアミノ酸配列、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加した（または挿入された）アミノ酸配列、あるいは配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記（10）項記載のCD100またはその塩などがあげられる。

また、本発明におけるCD72に関して、具体的には、公知のCD72またはその塩〔ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、144巻、4870-4877頁(1990)；ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、149巻、880-886頁(1992)〕などがあげられる。マウスCD72についてはザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、149巻、880-886頁(1992)に記載されているLyb-2^{a.1}, Lyb-2^{a.2}, Lyb-2^b, Lyb-2^cなどのアロタイプも含まれる。さらにCD72に関して、

(12) 配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド（以下、CD72と略称する）またはその塩、または

(13) ポリペプチドが、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列に1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加した（または挿入された）アミノ酸配列、あるいは配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記（12）項記載のCD72またはその塩などがあげられる。

【0007】

本明細書において、「実質的に同一」とはポリペプチドなどの活性、例えば、リガンド（CD100）と受容体（CD72）の結合活性、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入はし

ばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたポリペプチド（いわゆるCD100改変体、CD72改変体など）は、そうした置換、欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明で用いられるCD100およびCD72の製造法を以下にさらに詳細に説明する。

本発明で用いられるCD100およびCD72としては、ヒト、温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）および魚類などのあらゆる組織（たとえば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するポリペプチドであって、CD100としては、配列番号：1または配列番号：3、CD72としては配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであれば如何なるものであってもよい。配列番号：1、3、5または7で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1、3、5または7で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。例えば、CD72としては、配列番

号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達活性、抗体産生能などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。CD 1 0 0としては、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばレセプター結合活性、抗体産生活性などが挙げられる。実質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0 0 0 9】

本明細書におけるCD 7 2およびCD 1 0 0はペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。例えば、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：7で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが挙げられる。

本発明で用いられるCD 7 2およびCD 1 0 0の塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いら

れるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるCD72およびCD100は、公知の方法〔ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、144巻、4870-4877頁(1990)；ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、149巻、880-886頁(1992)；プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc Natl Acad Sci USA) 93巻、(1996年)11780-11785頁；ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)271巻、(1996年)33376-33381頁〕に準じた方法、即ち、ヒトや温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することもできるし、後述のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。また、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

ヒト、温血動物、魚類などの組織または細胞から製造する場合、ヒト、温血動物、魚類などの組織または細胞をホモジナイズした後、酸、有機溶媒などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0010】

上記したように本発明で用いられるCD72およびCD100は、自体公知のポリペプチドの合成法に従って、あるいはポリペプチドを含有するポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、ポリペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的の

ペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせてポリペプチド(CD72, CD100)を精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0011】

CD72およびCD100のアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドを取得する

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBTなど）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。

保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基

としては、たとえばRとして上記したC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBT）とのエステル〕などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

【0012】

保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃～40℃

の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

CD72およびCD100のアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。

CD72およびCD100のエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

【0013】

本発明で用いられるCD72をコードするDNAとしては、配列番号：5または配列番号：7で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、本発

明で用いられるCD100をコードするDNAとしては、配列番号：1または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するリガンド蛋白質をコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

より具体的には、(1)ストリンジェントな条件下で、配列番号：5または配列番号：7 (または、配列番号：1または配列番号：3) で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDNA、(2)遺伝コードの縮重のため、配列番号：5または配列番号：7 (または、配列番号：1または配列番号：3) で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジェントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄·H₂O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1% SDSである。

【0014】

本発明で用いられるCD72またはCD100をコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

CD72またはCD100を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、ポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増

幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えばポリペプチドの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。

クローン化された本発明で用いられるCD72またはCD100をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明で用いられるCD72またはCD100の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明で用いられるCD72またはCD100をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0015】

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、Trpプロモーター

、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクター α （MF α ）・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたCD72またはCD100をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0016】

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッツ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

【0017】

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12 などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 [以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 13巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO、DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO

(d h f r⁻CHO細胞)，マウスL細胞，マウス3T3細胞、マウスミエローマ細胞，ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2/O細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene) , 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

【0018】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6巻, 47-55頁 (1988年) などに記載の方法に従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法 [Feigner, P.L. et al. プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America) , 84巻, 7413頁 (1987年)]、リン酸カルシウム法 [Graham, F.L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456-467頁 (1973年)]、電気穿孔法 [Neumann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) , 1巻, 841-845頁 (1982年)] 等が挙げられる。

このようにして、本発明で用いられるCD72またはCD100をコードする

DNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

なお、動物細胞を用いて、本発明で用いられるCD72またはCD100等を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことによりポリペプチド等の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、dhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子とともに、ポリペプチドまたはその部分ペプチド等をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

上記の形質転換体をポリペプチド等(CD72, CD100)をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、ポリペプチド等を生成、蓄積せしめることによって、ポリペプチド等を製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0019】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために

、たとえば β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 $15 \sim 43^{\circ}\text{C}$ で約 $3 \sim 24$ 時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 $30 \sim 40^{\circ}\text{C}$ で約 $6 \sim 24$ 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 77巻, 4505(1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約 $5 \sim 8$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 $20^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$ で約 $24 \sim 72$ 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0020】

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約 $6.2 \sim 6.4$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 27°C で約 $3 \sim 5$ 日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約 $5 \sim 20\%$ の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of The American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of The Society for The Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約 $6 \sim 8$ であるのが好ましい。培養は通常約 $30^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ で

約 1 5 ～ 6 0 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特に CHO (dhfr⁻) 細胞および dhfr 遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含む DMEM 培地を用いるのが好ましい。

【 0 0 2 1 】

上記培養物から本発明で用いられる CD 7 2 または CD 1 0 0 を分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

本発明で用いられる CD 7 2 または CD 1 0 0 を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトン X-1 0 0 (登録商標。以下、TM と省略することがある。) などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中に本発明で用いられる CD 7 2 または CD 1 0 0 が分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明で用いられる CD 7 2 または CD 1 0 0 の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせることで行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【 0 0 2 2 】

かくして得られる本発明で用いられる CD 7 2 または CD 1 0 0 が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換す

ることができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明で用いられるCD72またはCD100を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0023】

CD100またはその塩をリガンドとして用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体（例、CD72またはその塩）との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、またはCD100またはその塩をリガンドとして用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体（例、CD72またはその塩）との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット（以下、本発明のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング用キットと略記する）について以下に詳述する。

受容体としてCD72またはその塩を用いるか、または組換え型CD72の発現系を構築し、該発現系を用いたCD100またはその塩との結合アッセイ系（リガンド・レセプターアッセイ系）を用いることによって、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。

このような化合物には、CD72を介して抗体産生促進活性（例えば、抗体産生、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（即ちCD72アゴニスト）と該抗体産生促進活性を有しない化合物（即ちCD72アンタゴニスト）などが含まれる。「CD100またはその塩とその受容体（

例、CD72またはその塩）との結合性を変化させる」とは、CD100またはその塩とその受容体（例、CD72またはその塩）との結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

【0024】

すなわち、本発明は、(i) CD72またはその塩に、CD100またはその塩を接触させた場合と(ii) 上記したCD72またはその塩に、CD100またはその塩および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) 上記したCD72またはその塩に、CD100またはその塩を接触させた場合と(ii) 上記したCD72またはその塩に、CD100またはその塩および試験化合物を接触させた場合における、例えば該CD72またはその塩に対するリガンドの結合量、抗体産生促進活性などを測定して、比較する。

【0025】

本発明のスクリーニング方法は具体的には、

- ① 標識したCD100またはその塩を、上記したCD72またはその塩に接触させた場合と、標識したCD100またはその塩および試験化合物をCD72またはその塩に接触させた場合における、標識したCD100またはその塩の該CD72またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ② 標識したCD100またはその塩を、CD72またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識したCD100またはその塩および試験化合物をCD72またはその塩を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したCD100またはその塩の該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したCD 1 0 0またはその塩を、CD 7 2をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したCD 7 2またはその塩に接触させた場合と、標識したCD 1 0 0またはその塩および試験化合物をCD 7 2をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したCD 7 2またはその塩に接触させた場合における、標識したCD 1 0 0またはその塩のCD 7 2またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするCD 1 0 0またはその塩とCD 7 2またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0 0 2 6】

④CD 7 2またはその塩を活性化する化合物（例えば、CD 1 0 0またはその塩）をCD 7 2またはその塩を含有する細胞に接触させた場合と、CD 7 2またはその塩を活性化する化合物および試験化合物をCD 7 2またはその塩を含有する細胞に接触させた場合における、CD 7 2またはその塩を介した抗体産生促進活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするCD 1 0 0またはその塩とCD 7 2またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤CD 7 2またはその塩を活性化する化合物（例えば、CD 1 0 0またはその塩など）をCD 7 2をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したCD 7 2またはその塩に接触させた場合と、CD 7 2またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を、CD 7 2をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したCD 7 2またはその塩に接触させた場合における、CD 7 2またはその塩を介する抗体産生促進活性（例えば、抗体産生、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするCD 1 0 0またはその塩とCD 7

2 またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

【 0 0 2 7 】

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる C D 7 2 としては、上記の C D 7 2 を含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒト、温血動物、魚類などの臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた C D 7 2 またはその塩などが適している。

C D 7 2 またはその塩を製造するには、前述の方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、C D 7 2 またはその塩を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

C D 7 2 またはその塩を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

C D 7 2 またはその塩を含有する細胞としては、C D 7 2 またはその塩を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (5 0 0 r p m ~ 3 0 0 0 r p m) で短時間 (通常、約 1 分 ~ 1 0 分) 遠心し、上清をさらに高速 (1 5 0 0 0 r p m ~ 3 0 0 0 0 r p m) で通常 3 0 分 ~ 2 時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した C D 7 2 またはその塩と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0028】

該CD72またはその塩を含有する細胞や膜画分中のCD72またはその塩の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当なCD72画分と、標識したリガンド（CD100）が用いられる。CD72画分としては、天然型のCD72画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型CD72画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド（CD100）、標識したリガンド（CD100）アナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンド（CD100）などを利用することができる。特に、ボルトン-ハンター試薬を用いて公知の方法で調製したCD100またはCD100誘導体の標識体を利用することもできる。

具体的には、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずCD72またはその塩を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適した緩衝液に懸濁することによりレセプター標品を調製する。緩衝液には、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液などのリガンドとレセプターとの結合を阻害しない緩衝液であればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤を緩衝液に加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるCD72やCD100の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識したCD100を添加し、同時に $10^{-4} \sim 10^{-1} \mu\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NS

B)を知るために大過剰の未標識のCD100またはその塩を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同緩衝液で洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - NSB$)を100%とした時、特異的結合量($B - NSB$)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

また、CD72またはその塩とCD100またはその塩との結合を測定する方法として、BIAcore (アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いることもできる。この方法では、CD100またはその塩あるいはその誘導体を装置に添付のプロトコルに従ったアミノカップリング法によってセンサーチップに固定し、CD72またはその塩を含有する細胞またはCD72をコードするDNAを含有する形質変換体から精製したCD72またはその塩またはCD72またはその塩を含む膜画分、あるいは精製したCD72またはその塩またはCD72またはその塩を含む膜画分および試験化合物を含むリン酸緩衝液またはトリス緩衝液などの緩衝液をセンサーチップ上を毎分2-20 μ lの流量で通過させる。センサーチップ上のCD100またはその塩とCD72またはその塩とが結合することによって生じる表面プラズモン共鳴の変化を共存する試験化合物が変化させることを観察することによってCD72またはその塩とCD100またはその塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。この方法は、CD72またはその塩をセンサーチップに固定し、CD100またはその塩、またはCD100またはその塩および試験化合物を含むリン酸緩衝液またはトリス緩衝液などの緩衝液をセンサーチップ上を通過させる方法を用いても同様に測定することができる。試験化合物としては、上記と同様のものなどがあげられる。

【0029】

CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合

物をスクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、CD72またはその塩を介する抗体産生促進活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、CD72またはその塩を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当な緩衝液に交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。抗体産生促進活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

抗体産生促進活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なCD72またはその塩を発現した細胞が必要である。CD72またはその塩を発現した細胞としては、前述の組換え型CD72発現細胞株などが望ましい。形質変換体であるCD72発現細胞は安定発現株でも一過性発現株でも構わない。また、動物細胞の種類は上記と同様のものが用いられる。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。

【0030】

上記のリガンド・レセプターアッセイ系について、さらに具体的に記載すると以下のようなアッセイ系が用いられる。

(1) 受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のクラススイッチ、IgM以外クラスの抗体IgG、IgA、IgD、IgEのいずれかの産生、分泌が促進される現象が生じる。産生、分泌された抗体量はELISA

法により、直接的、または間接的に標識した抗Ig抗体を用いることによって受容体アゴニストの抗体産生促進活性を測定することができる。この反応を利用してCD100のCD72発現細胞に対する抗体産生促進活性を測定することができる。具体的には、後述の実施例2およびそれに準じた方法により行われる。ここにおいて、CD100またはその塩、あるいはCD100またはその塩および試験化合物を添加し、CD100またはその塩の単独投与に比べて抗体産生促進活性に変化が生じることを観察することによってCD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。このとき、CD100によるCD72発現細胞へ抗体産生促進活性を抑制する活性を示す化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、CD72発現細胞への抗体産生促進活性を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一例についてより具体的に以下に述べる。後述の実施例2に述べた方法によって調製した 1×10^5 cells/well 脾臓由来休止B細胞を抗CD40モノクローナル抗体、IL-4 100 units/mlと共に、パラホルムアルデヒドで固定した正常、CD100を発現するCHO細胞(2×10^4 cells/well)の存在下で、平底96穴マイクロタイタープレートで約7日間培養する。IgMまたはIgG1免疫グロブリンの産生をELISA法により測定する。具体的には、培養液または対照のIgM, IgGを0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)を用いて希釈し、EIA用96穴イムノプレート(マキシソープ: ヌンク社)の各ウェルに100 μ lずつ注入して約4℃で一晩放置して添着する。各ウェルを緩衝液A(0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)で洗浄後、緩衝液B(0.1%BSA、0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液)で希釈した酵素標識した抗IgM, IgG、IgA、IgD、IgE抗体溶液100 μ lを加えて25℃でさらに約2時間反応させる。各ウェルを緩衝液Aで洗浄し、アルカリフォスファターゼ基質溶液(1mg/mlフォスファターゼ基質(シグマ)、100mM Tris(pH9.5)、100mM NaCl、5mM MgCl₂)を100 μ l加え25℃で30分間反応させる。マイクロプレート用自動比

色計を用い、405 nmにおける吸光度を測定する。CD100またはその塩のみを加えた実験区の吸光度を100%、CD100またはその塩を加えなかった実験区の吸光度を0%とし、CD100またはその塩による抗体産生促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。抗体産生促進活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0031】

CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、CD72またはその塩、CD72またはその塩を含有する細胞、あるいはCD72またはその塩を含有する細胞の膜画分、およびCD100またはその塩を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②CD72 標品

CD72またはその塩を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したCD100またはその塩。

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

④リガンド標準液

CD100またはその塩を0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1 mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0032】

2. 測定法

① 12穴組織培養用プレートにて培養したCD72またはその塩を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識したCD100またはその塩を5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μ l加えておく。

③ 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④ 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

【0033】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物であり、具体的にはCD72またはその塩を介して抗体産生促進活性を有する化合物またはその塩（いわゆるCD72アゴニスト）、あるいは該抗体産生促進活性を有しない化合物（いわゆるCD72アンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記CD72アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法

は以下の (i) または (ii) に従えばよい。

(i) 前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、CD100またはその塩とCD72またはその塩との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記したCD72を介する抗体産生促進活性を有しているか否かを測定する。抗体産生促進活性を有する化合物またはその塩はCD72アゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩はCD72アンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物をCD72またはその塩を含有する細胞に接触させ、上記CD72またはその塩を介した抗体産生促進活性を測定する。抗体産生促進活性を有する化合物またはその塩はCD72アゴニストである。

(b) CD72またはその塩を活性化する化合物（例えば、CD100またはCD72アゴニストなど）をCD72またはその塩を含有する細胞に接触させた場合と、CD72またはその塩を活性化する化合物および試験化合物をCD72またはその塩を含有する細胞に接触させた場合における、CD72またはその塩を介した抗体産生促進活性を測定し、比較する。CD72またはその塩を活性化する化合物による抗体産生促進活性を減少させ得る化合物またはその塩はCD72アンタゴニストである。

該CD72アゴニストは、CD72またはその塩に対するCD100またはその塩が有する生理活性と同様の作用を有しているので、CD100またはその塩と同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、CD72アンタゴニストは、CD72またはその塩に対するCD100またはその塩が有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

さらにCD72またはその塩はCD72アンタゴニストと同様、CD100またはその塩が有する生理活性を抑制することができるので、安全で低毒性な医薬として有用である。

CD100またはその塩はクラススイッチを誘導する作用および抗体産生促進作用などに関与していることから、抗体産生誘導剤、免疫賦活剤などとして用いることができる。したがって、上記のスクリーニング方法またはスクリーニング

用キットを用いて得られる化合物のうち、CD72アゴニストはウイルスによる感染症または疾病（かぜ症候群、インフルエンザ、エイズ、肝炎、ヘルペス、麻疹、水痘、手足口病、带状疱疹、伝染性紅斑、風疹、突発性発疹、ウイルス性結膜炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス肺炎、ウイルス性脳炎、ラッサ熱、エボラ出血熱、マールブルグ病、コンゴ出血熱、黄熱病、デング熱、狂犬病、成人T細胞白血病（ATL）、ロタウイルス感染症、ポリオ、おたふくかぜなど）、細菌または真菌による感染症または疾病（細菌性食中毒、細菌性下痢、結核、ハンセン氏病、赤痢、腸チフス、コレラ、パラチフス、ペスト、破傷風、野兔病、ブルセラ症、炭疽、敗血症、細菌性肺炎、皮膚真菌症など）、癌（口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、脾臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色腫、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病など）などの予防・治療薬などとして用いることができ、CD72アンタゴニスト（またはCD72またはその塩）は異常抗体産生または過度の抗体産生によってもたらされる疾病（アトピー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性気管支炎、肺アスペルギルス症、寄生虫疾患、木村氏病、高IgE症候群、Wiskott-Aldrich症候群、胸腺形成不全症、Hodgkin病、肝硬変、急性肝炎、慢性関節リウマチ、インシュリン依存性糖尿病、全身性エリトマトーデス、強皮症、不妊症、子宮内膜症、自己免疫性甲状腺疾患重症筋無力症、橋本病、Basedow病、悪性貧血、Addison病、男性不妊症、多発性硬化症、Goodpasture症候群、天疱瘡、類天疱瘡、重症筋無力症、水晶体性眼炎、交感性眼炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、自己免疫性白血球減少症、Feltz症候群、自己免疫性リンパ球減少症、潰瘍性大腸炎、Sjogren症候群、全身性自己免疫疾患、原発性胆汁性肝硬変症、ルポイド肝炎など）の予防・治療薬などとして用いることができる。

【0034】

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、

無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-オルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩があげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0035】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチ

ン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムの様な結合剤、結晶性セルロースの様な賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などの様な膨化剤、ステアリン酸マグネシウムの様な潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンの様な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーの様な香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂の様な液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水の様なベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの様な天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0036】

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0037】

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

【0038】

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる

化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 から 1000 mg、好ましくは約 1.0 から 300 mg、より好ましくは約 3.0 から 50 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の肥満症患者（体重 60 kg として）への投与においては、一日につき約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

CD72 またはその塩を医薬として用いる場合、上記の本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を医薬として使用する場合と同様にして製剤化および実施することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L 体を示すものとする。

【0039】

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
Y	: チミンまたはシトシン
N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
R	: アデニンまたはグアニン
M	: シトシンまたはアデニン
W	: チミンまたはアデニン

Pro または P : プロリン
 Asn または N : アスパラギン
 Gln または Q : グルタミン
 pGlu : ピログルタミン酸
 Me : メチル基
 Et : エチル基
 Bu : ブチル基
 Ph : フェニル基
 TC : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
 Bom : ベンジルオキシメチル
 NMP : N-メチルピロリドン
 PAM : フェニルアセトアミドメチル

【0041】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Tos : p-トルエンスルフォニル
 HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
 Bzl : ベンジル
 Cl₂-Bzl : ジクロロベンジル
 Z : ベンジルオキシカルボニル
 Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
 Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
 Boc : t-ブチルオキシカルボニル
 HOBT : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
 DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
 TFA : トリフルオロ酢酸
 Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
 DNP : ジニトロフェニル
 Bum : ターシャリーブトキシメチル

Trt: トリチル

BSA: ウシ血清アルブミン

CHAPS: 3-[(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ]-1-プロパ
ンスルホナート

E64: (L-3-trans-カルボキオキシラン-2-カルボニル) L-ロイシ
ルーアグマチン

DNP-OVA: ジニトロフェニルオバルブミン

DNP-BSA: ジニトロフェニルウシ血清アルブミン

ELISA: エンザイムリンクドイミュノソーベントアッセイ

EIA: エンザイムイミュノソーベントアッセイ

PBS: フォスフェートバッファードサリーン

LPS: リポポリサッカライド

conA: コンカナバリンA

【0042】

本願明細書の配列番号は以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕 マウスCD100のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕 マウスCD100の塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕 ヒトCD100のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕 ヒトCD100の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕 マウスCD72のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕 マウスCD72の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕 ヒトCD72のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：8〕 ヒトCD72の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕 参考例1に記載されるmCD100-Fcを作製するために使
用されたN端側のプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕 参考例1に記載されるmCD100-Fcを作製するために
使用されたC端側のプライマーの塩基配列を示す。

【0043】

【実施例】

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0044】

参考例1 CD40刺激により発現が増強されるCD100の単離

1×10^8 個のマウスB細胞株WEHI 231細胞を抗CD40抗体、HM40-3（ファージン社）を用いて8時間刺激した。刺激しない細胞とした細胞より全RNAをグアニジンイソチオシアネートフェノール法により単離し、mRNAをOLIGO（DT）結合マグネチックビーズ（プロメガ）を用いて精製した。PCR-SELECT cDNA サブトラクションキット（クローンテック）を用いて、cDNA合成およびサブトラクションクローニングを行った。CD40刺激によって生じたcDNA断片は直接T/Aベクター（インビトロジェン）に挿入した。得られた塩基配列を比較した結果、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー（Journal of Biological Chemistry 271, 33376-33381 (1996)）に記載されるCD100遺伝子が単離された。

後述の実施例1、3に記載されるmCD100-FcはマウスCD100に可溶化型ヒトIgG1 Fc部分を融合させた蛋白質である。具体的にはセンス方向のSalI siteを含むプライマー(gctgtcgactgtgtgcccgttgctgaaggcct)〔配列番号：9〕とアンチセンス方向のBamHI siteを含むプライマー(gacggatcctacttactttgctttgcttgagatacacccgtcttctctga)〔配列番号：10〕の組み合わせからなるオリゴヌクレオチドを用いて、PCR法によりCD40で刺激したWEHI 231細胞から抽出したマウスCD100 cDNAより分泌型マウスCD100 cDNAを調製した。得られたSalI-BamHI断片をpEFBosヒトIgG1 FcカセットのSalI-BamHI断片DNA断片に挿入し、mCD100-Fc蛋白質を発現する遺伝子を作製した。その遺伝子を電気穿孔法(バイオラッドジーンパルサーを用いて、0.25kV、960microFDで行う)によりP3U1プラズマサイトーマに導入し形質転換細胞を作製した。具体的には、50μgのHindIIIで切断したpEFB

o s - m C D 1 0 0 - F c プラスミド DNA と B a m H I で切断した p M C 1 n e o ベクターで 10^7 個の細胞を形質転換した。10%の牛胎児血清と 0.3 mg/ml の G 4 1 8 を含む R P M I 培養液で 10 日間培養した後、G 4 1 8 に耐性のコロニーを単離してクローン化した。m C D 1 0 0 - F c 蛋白質はプロテイン A セファロース（ファルマシア）により培養液中より精製した。

後述の実施例 1 に記載されるビオチン化 m C D 1 0 0 - F c はビオチン化キット（ベーリンガー・マンハイム）により、m C D 1 0 0 - F c にビオチンを結合したものである。実施例 2 に記載される C D 1 0 0 を発現する C H O 細胞に関しては C D 1 0 0 遺伝子が C H O 細胞内に導入された形質転換細胞であり、C D 1 0 0 蛋白質を発現する。具体的には C D 1 0 0 c D N A 全長を p E F B O S v e c t o r に組み込み、p M C 1 n e o ベクターと共に、電気穿孔法（バイオラッド ジーン パルサー を用いて、0.25 kV、960 microFD で行う）により C H O 細胞に導入した。G 4 1 8 0.3 mg/ml 存在下で、選択した。10 日後、G 4 1 8 耐性の細胞を選択した。

【0045】

参考例 2 C D 1 0 0 と結合する分子 C D 7 2 の単離

C 5 7 B L / 6 マウス由来 2 B 4 細胞を 10% 牛胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培養液を用いて培養し、 1×10^6 cells/ml の 2 B 4 細胞を 2 μ g/ml の c o n A で 18 時間刺激した。細胞より全 RNA をグアニジンイソチオシアネート密度勾配遠心により単離し、全 RNA より o l i g o (d T) 結合マグネチックビーズ（プロメガ）を用いて、mRNA を選択した。o l i g o (d T) を含む 2 本鎖 c D N A を S u p e r S c r i p t I I c D N A 合成キット（ライフテクノロジー）を用いて合成した。その c D N A に B s t X I アダプター（インビトロジェン）を付加し、1% アガロースゲル電気泳動法により分画した。1.0 k-b 以上の c D N A を回収し、B s t X I で切断した p M E 1.8 S ベクターに挿入した。その挿入した DNA を用いて、電気穿孔法（バイオラッド ジーン パルサー を用いて、0.25 kV、960 microFD で行う）により大腸菌 D H 1 0 B 細胞（ライフテクノロジー）を形質転換した。 2×10^7 個の独立したクローンより成る大腸菌より得られた p l a s m i d を用いて、C O

S7細胞をlipofectamine plusを用いて形質転換した。形質転換3日後、細胞を回収し、5%牛胎児血清、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Fc block、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ビオチン化 mCD100-Fcを含むPBSで 5×10^6 cells/mlの濃度に再懸濁し、氷上で1時間静置した。細胞を氷冷PBSで洗浄し、M-280ストレプトアビジンが結合したダイナビーズを含むPBSに懸濁した。懸濁30分後、細胞をMagnetic Particle Concentratorを用いて氷冷PBSで10回洗浄した。染色体外プラスミドDNAをHirt法(Proceeding of National Academy sciences of USA 84, 3365-3369 (1987))を用いて抽出した。そのプラスミドDNAを大腸菌DH10B細胞に電気穿孔法(バイオラッドジーンパルサーを用いて、 0.25 kV 、 960 microFD で行う)で挿入しプロトプラスト融合法により2回目、3回目、4回目の形質転換を行った。上記の磁力による抽出を4回繰り返した。その結果、 1.4 kb の明らかなバンドが認められた。この 1.4 kb のcDNAクローンについて塩基配列を解析した結果、マウスCD72のcDNA全長〔配列番号：6〕であった。

実施例1に記載されるCD72を発現するCHO細胞に関してはCD72遺伝子がCHO細胞内に導入された形質転換細胞であり、CD72蛋白質を発現する。

具体的にはCD72を組み込んだpME18SベクターをpMC1neoベクターと共に、電気穿孔法(バイオラッドジーンパルサーを用いて、 0.25 kV 、 960 microFD で行う)によりCHO細胞に導入した。G418 $0.3 \text{ mg}/\text{ml}$ 存在下で、選択した。10日後、G418耐性の細胞を選択した。

【0046】

実施例1 CD100とCD72との結合

mCD100-Fcはビオチン化キットを用いてビオチン化した。フローサイトメトリーによる解析を行うために、 10^6 個の対照のCHO細胞とCD72を発現するCHO形質転換細胞を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のFcブロック(ファーマンジェン)を含む染色緩衝液(2%牛胎児血清、0.02%アジ化ナトリウム、2mM塩化カルシウム、1mM塩化マグネシウムを含むPBS)中で、1時間氷上でビオチ

ン化mCD100-Fc ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) と反応させた。染色緩衝液で洗浄後、細胞をFITC標識ストレプトアビジン (ベクトンディッキンソン) で20分染色した。細胞を染色緩衝液で洗浄後、フローサイトメーターでFITC標識ストレプトアビジンが結合する細胞を解析した。

図1にその結果を示す。左側の図は対照のCHO細胞、右側の図はCD72を発現しているCHO細胞の結果を示す。点線はmCD100-Fcを添加しなかった場合、実線はmCD100-Fcを添加した場合の結果を示す。図中横軸は1細胞当たりの蛍光強度を、縦軸は細胞数を相対的に示す。左図のCHO細胞では、ビオチン化mCD100-Fcを添加しても蛍光強度は変化しなかった。

これはCHO細胞がビオチン化mCD100-Fcと結合しないことを示す。

右側のCD72を発現するCHO細胞では、ビオチン化mCD100-Fcを添加すると (実線)、添加しない場合 (点線) に比べて蛍光強度が強くなった。これはビオチン化mCD100-FcがCD72を発現するCHO細胞表面上のCD72と結合することを示す。

【0047】

実施例2 マウスCD100のクラススイッチ増強作用

1×10^5 cells/well に調製した C57BL/6 マウス脾臓由来休止B細胞を抗CD40モノクローナル抗体またはIL-4 100 units/ml 100units/ml と共に、パラホルムアルデヒドで固定した正常、CD100を発現するCHO細胞 (2×10^4 cells/well) の存在下で、平底96穴マイクロタイタープレートで7日間培養した。IgM またはIgG1免疫グロブリンの産生をELISA法により測定した。具体的には、培養液または対照のIgM, IgGを0.1M炭酸緩衝液 (pH9.6) を用いて希釈し、EIA用96穴イムノプレート (マキシソープ: ヌンク社) の各ウェルに100 μ l ずつ注入して約4℃で一晩放置して添着した。各ウェルを緩衝液A (0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液) で洗浄後、緩衝液B (0.1% BSA、0.15M NaClを含むpH7.0の0.02Mリン酸緩衝液) で希釈した酵素標識した抗IgM, IgG, IgA, IgD, IgE抗体溶液100 μ lを加えて25℃でさらに約2時間反応させた。各ウェルを緩衝液

Aで洗浄し、アルカリフォスファターゼ基質溶液（1mg/ml フォスファターゼ基質（シグマ）、100mM Tris（pH9.5）、100mM NaCl、5mM MgCl₂）を100μl加え25℃で30分間反応させた。マイクロプレート用自動比色計を用い、405nmにおける吸光度を測定した。別に、既知量のIgM、IgG1を添着して、吸光度と抗体量の定量曲線を取ることで、各反応液中の抗体量を定量した。

実験は、（1）CD100発現CHO細胞非存在下で培養液（Medium）のみ添加した場合（2）CD100発現CHO細胞存在下で培養液（Medium）のみ添加した場合（3）CD100発現CHO細胞非存在下で抗CD40抗体（αCD40）、IL-4を添加した場合（4）CD100発現CHO細胞存在下で抗CD40抗体（αCD40）、IL-4を添加した場合に分けてIgM量、IgG1量を比較した。図2にその結果を示す。横軸は左からそれぞれ（1）（2）（3）（4）の結果を、縦軸は吸光度より定量した抗体量（単位 ng/ml）を示す。無添加対照群（1）に比較して、CD100が存在する場合（2）、IgM、IgG1共に抗体産生に影響を及ぼさない。無添加対照群（1）に比べて、抗CD40抗体とIL-4で刺激した場合（3）、IgM、IgG1共に抗体産生を誘導する。CD100存在下で抗CD40抗体とIL-4で刺激した場合（4）、抗CD40抗体とIL-4で刺激した場合に比べて、IgM産生はやや減少気味なのに対して、IgG1産生は（3）に比べてさらに強く上昇した。このことは、B細胞より産生、分泌される抗体のクラスがIgMからIgG1へスイッチされる現象、いわゆるクラススイッチが誘導されたことを示している。

【0048】

実施例3 CD100の生体内抗体産生増強作用

100μgのアルミで調製したDinitrophenyl ovalbumin（DNP-OVA）をC57BL/6マウス腹腔内に接種し、免疫した。免疫後、ヒトIgG1ミエローマ蛋白質、あるいはmCD100-Fcを200μg/day、10日間投与した。DNP-BSA投与6日後、10日後に血清を採集した。DNPに特異的な抗体の抗体価をDNP-BSAを用いたELISA法により測定した。具体的には、免疫後のマウスの血清を0.1M炭酸緩衝

液 (pH 9.6) を用いて希釈し、DNP-BSA でコートした EIA 用 96 穴 イムノプレート (マキシソープ: ヌンク社) の各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ注入して 4°C で一晩放置して添着した。各ウェルを緩衝液 A (0.15M NaCl を含む pH 7.0 の 0.02M リン酸緩衝液) で洗浄後、緩衝液 B (25% ブロックス (大日本製薬)、 0.15M NaCl を含む pH 7.0 の 0.02M リン酸緩衝液) で希釈したアルカリフォスファターゼで標識した抗マウス IgM, IgG1、抗体溶液 $100 \mu\text{l}$ を加えて 25°C でさらに 2 時間反応させ、ウェルに添着している抗 DNP-BSA 抗体に結合させた。各ウェルを緩衝液 A で洗浄し、アルカリフォスファターゼ基質溶液を $100 \mu\text{l}$ 加え 25°C で 30 分間反応させ、マイクロプレート用自動比色計を用い 405nm における吸光度を測定した。DNP 特異的抗体を定量した。

図 3 にその結果を示す。左側の図は DNP-BSA 投与 6 日後、右側の図は 10 日後の血清中に含まれる DNP に対する抗体価を示す。横軸の \square は ヒト IgG1 ミエローマ蛋白質を、 \blacksquare は mCD100-Fc を投与した場合の抗体価を示す。縦軸 Anti-DNP は DNP に対する抗体価を示す。投与 12 日後の対照群のマウスの血清中に含まれる DNP に対する抗体量の 1000 分の 1 を 1unit とした。CD100 (mCD100-Fc) を投与した場合、6 日目の抗体価は、対照のヒト IgG1 ミエローマ蛋白質を投与した場合の 6 日目の抗体価を 3 倍以上回るものであり、対照のヒト IgG1 ミエローマ蛋白質を投与した場合の 10 日目の抗体価を上回るものであった。

【0049】

【発明の効果】

本発明の CD72 またはその塩および CD100 またはその塩を用いることを特徴とする CD72 またはその塩と CD100 またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法は、ウイルスによる感染症または疾病 (かぜ症候群、インフルエンザ、エイズ、肝炎、ヘルペス、麻疹、水痘、手足口病、带状疱疹、伝染性紅斑、風疹、突発性発疹、ウイルス性結膜炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス肺炎、ウイルス性脳炎、ラッサ熱、エボラ出血熱、マールブルグ病、コンゴ出血熱、黄熱病、デング熱、狂犬病、成人 T 細胞白血病 (AT

L)、ロタウイルス感染症、ポリオ、おたふくかぜなど)、細菌または真菌による感染症または疾病(細菌性食中毒、細菌性下痢、結核、ハンセン氏病、赤痢、腸チフス、コレラ、パラチフス、ペスト、破傷風、野兎病、ブルセラ症、炭疽、敗血症、細菌性肺炎、皮膚真菌症など)、癌(口腔癌、咽頭癌、口唇癌、舌癌、歯肉癌、鼻咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸癌を含む大腸癌、肝臓癌、胆のう癌、膵臓癌、鼻腔癌、肺癌、骨肉腫、軟部組織癌、皮膚癌、黒色腫、乳癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、陰茎癌、膀胱癌、腎臓癌、脳腫瘍、甲状腺癌、リンパ腫、白血病など)などの予防・治療薬などとして用いることができるCD72アゴニスト、異常抗体産生または過度の抗体産生によってもたらされる疾病(アトピー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性気管支炎、肺アスペルギルス症、寄生虫疾患、木村氏病、高IgE症候群、Wiskott-Aldrich症候群、胸腺形成不全症、Hodgkin病、肝硬変、急性肝炎、慢性関節リウマチ、インシュリン依存性糖尿病、全身性エリトマトーデス、強皮症、不妊症、子宮内膜症、自己免疫性甲状腺疾患重症筋無力症、橋本病、Basedow病、悪性貧血、Addison病、男性不妊症、多発性硬化症、Goodpasture症候群、天疱瘡、類天疱瘡、重症筋無力症、水晶体性眼炎、交感性眼炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、自己免疫性白血球減少症、Feltz症候群、自己免疫性リンパ球減少症、潰瘍性大腸炎、Sjogren症候群、全身性自己免疫疾患、原発性胆汁性肝硬変症、ルポイド肝炎など)などの予防・治療薬などとして用いることができるCD72アンタゴニストのスクリーニング方法として有用である。

【0050】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Pharmaceutical

<130> A99109

<160> 10

<210> 1

<211> 861

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Arg Met Cys Ala Pro Val Arg Gly Leu Phe Leu Ala Leu Val Val
1 5 10 15
Val Leu Arg Thr Ala Val Ala Phe Ala Pro Val Pro Arg Leu Thr Trp
20 25 30
Glu His Gly Glu Val Gly Leu Val Gln Phe His Lys Pro Gly Ile Phe
35 40 45
Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Met Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Val
50 55 60
Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
65 70 75 80
Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ser Lys
85 90 95
Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
100 105 110
Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ser Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
115 120 125
Asn Ala Phe Gln Pro Thr Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
130 135 140
Phe Leu Gly Lys Ser Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
145 150 155 160
~~Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Gly Gly Glu Leu Tyr Ser Gly~~
165 170 175
Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
180 185 190
Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu

195	200	205
Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro		
210	215	220
Glu Gly Glu Asp Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val		
225	230	235
Glu Tyr Glu Phe Val Phe Lys Leu Met Ile Pro Arg Val Ala Arg Val		
245	250	255
Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr		
260	265	270
Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Lys Pro Asp Ser Gly Leu		
275	280	285
Val Phe Asn Ile Leu Gln Asp Val Phe Val Leu Arg Ala Pro Gly Leu		
290	295	300
Lys Glu Pro Val Phe Tyr Ala Val Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val		
305	310	315
Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Val Glu Ala Val		
325	330	335
Phe Ser Arg Gly Lys Tyr Met Gln Ser Ala Thr Val Glu Gln Ser His		
340	345	350
Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly		
355	360	365
Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu		
370	375	380
Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met		
385	390	395
Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Lys Leu Ile Lys Lys		
405	410	415
Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp		
420	425	430

Gly Thr Phe Tyr Asp Val Met Phe Ile Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
435 440 445

His Lys Ala Val Ile Leu Thr Lys Glu Val His Val Ile Glu Glu Thr
450 455 460

Gln Leu Phe Arg Asp Phe Glu Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu Ser Ser
465 470 475 480

Lys Lys Gly Arg Lys Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
485 490 495

Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Glu Lys His Gly Ser Cys Glu Asp Cys
500 505 510

Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Ala Ile Lys Ala
515 520 525

Cys Val Thr Leu His Gln Glu Glu Ala Ser Ser Arg Gly Trp Ile Gln
530 535 540

Asp Met Ser Gly Asp Thr Ser Ser Cys Leu Asp Lys Ser Lys Glu Ser
545 550 555 560

Phe Asn Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys
565 570 575

Phe Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Val Trp Lys Phe Gln Asn Gly
580 585 590

Glu Leu Lys Ala Ala Ser Pro Lys Tyr Gly Phe Val Gly Arg Lys His
595 600 605

Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Asp Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
610 615 620

~~Leu Ser Glu Glu Arg Val Arg Asn Lys Thr Val Ser Gln Leu Leu Ala~~
625 630 635 640

Lys His Val Leu Glu Val Lys Met Val Pro Arg Thr Pro Pro Ser Pro
645 650 655

Thr Ser Glu Asp Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Ile Thr Ser Lys Met

660	665	670
Pro Val Gly Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Leu Trp		
675	680	685
Ala Thr Ser Pro Arg Ala Ala Thr Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ser Gly		
690	695	700
Thr Ser Cys Glu Pro Lys Met Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu His		
705	710	715
Ser Glu Lys Thr Val Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu Met		
725	730	735
Ser Leu Leu Leu Phe Ile Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Ser Tyr		
740	745	750
Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Cys Leu Lys Phe Arg Ser		
755	760	765
Ala Leu Leu Leu Gly Lys Lys Thr Pro Lys Ser Asp Phe Ser Asp Leu		
770	775	780
Glu Gln Ser Val Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gln		
785	790	795
Gln Asn Gly Asp His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu Thr		
805	810	815
Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp Ser		
820	825	830
Gln Arg Ile Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val Lys		
835	840	845
Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp		
850	855	860

<210> 2

<211> 2769

<212> DNA

<213> Mouse

gaattcggca cgaggccatc catgtgtgcc cgttgctgaa ggcctcgggtg gcccctgccc 60
 atgaggatgt gtgcccccg tagggggctg ttcttggtccc tggtagtagt gttgagaacc 120
 gcggtggcat ttgcacctgt gcctcggctc acctgggaac atggagaggt aggtctggtg 180
 cagtttcaca agccaggcat ctttaactac tcggccttgc tgatgagtga ggacaaagac 240
 actctgtatg taggcgcccc ggaagcagtc ttgacagtga atgcgctgaa catctctgag 300
 aagcaacatg aggtatatgt gaaggtctct gaagacaaaa aatccaagtg tgcagagaag 360
 gggaaatcaa agcagacgga atgcctaaac tacattcgag tactacagcc actaagcagc 420
 acttccctct atgtgtgtgg gaccaatgcg ttccagccca cctgtgacca cctgaacttg 480
 acatccttca agtttctggg gaaaagtga gatggcaaag gaagatgccc cttcgacccc 540
 gccacagct acacatcagt catggttggg ggcgagctct actctgggac gtcctataat 600
 ttcttgggca gtgaacccat catctctcga aactcttccc acagtcctt gaggacggag 660
 tatgccatcc cgtggctgaa cgagcctagc ttcgtctttg ctgacgtgat ccagaaaagc 720
 ccagatggtc cggagggtga agatgacaag gtctacttct tttttacgga ggtatccgtg 780
 gagtacgaat tcgtcttcaa gttgatgatc ccgcgagttg ccagggtgtg caagggcgac 840
 cagggcgggc tgcggacttt gcaaaaaaag tggacctcct tcctaaaggc caggctgac 900
 tgctccaagc cagacagtgg cctggctctc aacatacttc aggatgtgtt tgtgctgagg 960
 gccccgggccc tcaaggagcc tgtgttctat gcggtcttca cccacagct gaacaatgtg 1020
 ggtctgtcag cgggtgtgcgc ctacacactg gccacggtgg aggcagtctt ctcccggtga 1080
 aagtacatgc agagtgccac agtggagcag tctcacacca agtgggtgcg ctacaatggc 1140
 ccagtgccca ctccccgacc tggagcgtgt atcgacagtg agggccgggc agccaactac 1200
 accagctcct tgaatctccc agacaaaaca ctgcagtttg taaaagacca ccctttgatg 1260
 gatgactcag tgaccccgat agacaacaga cccaagctga tcaaaaaaga tgtaaaactac 1320
 acccagatag tggtagacag gacccaggcc ctggatggga ctttctacga cgtcatgttc 1380
 atcagcacag accgggggagc tctgcataaa gcagtcatcc tcacaaaaga ggtgcatgtc 1440
 atcgaggaga cccaactctt ccgggactct gaaccggtcc taactctgct gctatcgtca 1500
 aagaagggga ggaagtttgt ctatgcaggc tccaactctg gagtgttcca agcgcccctg 1560
 gcattctgcg aaaagcacgg tagctgtgaa gactgtgtgt tagcacggga cccctactgt 1620
 gcctggagcc cagccatcaa ggcctgtgtt accctgcacc aggaagaggc ctccagcagg 1680

ggctggattc aggacatgag cggtgacaca tcctcatgcc tggataagag taaagaaagt 1740
 ttcaaccagc attttttcaa gcacggcggc acagcggaac tcaaatgttt ccaaaagtcc 1800
 aacctagccc ggggtggatg gaagttccag aatggcgagt tgaaggccgc aagtcccaag 1860
 tacggctttg tgggcaggaa gcacctgctc atcttcaacc tgtcggacgg agacagcggc 1920
 gtgtaccagt gcctgtcaga ggaaagggtg aggaataaaa cggtctccca gctgctggcc 1980
 aagcacgttc tggaagtga gatggtacct cggaccccc cctcacctac ctcagaggat 2040
 gttcagacag aaggtagtaa gatcacatcc aaaatgccgg ttggatctac ccagggggtcc 2100
 tctcccccta ccccggtct gtgggcaacc tccccagag ccgccaccct acctcccaag 2160
 tcctcctcgc gcacatcctg tgaaccaaag atgggtcatca acacgggtccc ccagctccac 2220
 tcagagaaga cgggtgtatc caagtccagt gacaaccgcc tgctcatgtc tctcctcctc 2280
 ttcatctttg tcctcttct ctgcctcttt tcctacaact gctacaaggg ctacctgccc 2340
 ggacagtgt taaaattccg ctacgccctg ctgcttgga agaaaacacc caagtcagac 2400
 ttctctgacc tggagcagag tgtgaaggag acactgggtc agcctgggag cttctcccag 2460
 cagaacggcg accaccccaa gccagccctg gatacgggt atgaaacgga gcaggacacc 2520
 atcaccagca aagtccccac ggatcgtgag gactcgcaac ggatcgatga actctctgcc 2580
 cgggacaaac cgtttgatgt caagtgtgaa ctgaagtttg cagattcgga tgctgacggg 2640
 gactgaggcc agcgtgtccc agcccatgcc cctctgtctt cgtggagagt gttgtgttga 2700
 gccattcag tagccgagtc ttgtcactct gtgccagcct cagtccgtg tccccTTTT 2760
 ctctggttt 2769

<210> 3

<211> 862

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Arg Met Cys Thr Pro Ile Arg Gly Leu Leu Met Ala Leu Ala Val

1

5

10

15

Met Phe Gly Thr Ala Met Ala Phe Ala Pro Ile Pro Arg Ile Thr Trp

20

25

30

Glu His Arg Glu Val His Leu Val Gln Phe His Glu Pro Asp Ile Tyr

35	40	45
Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Ile		
50	55	60
Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu		
65	70	75
Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ala Lys		
85	90	95
Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile		
100	105	110
Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr		
115	120	125
Asn Ala Phe Gln Pro Ala Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys		
130	135	140
Phe Leu Gly Lys Asn Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro		
145	150	155
Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly		
165	170	175
Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser		
180	185	190
Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu		
195	200	205
Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Arg Lys Ser Pro Asp Ser Pro		
210	215	220
Asp Gly Glu Asp Asp Arg Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val		
225	230	235
Glu Tyr Glu Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Pro Arg Ile Ala Arg Val		
245	250	255
Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr		
260	265	270

Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Arg Pro Asp Ser Gly Leu
 275 280 285

Val Phe Asn Val Leu Arg Asp Val Phe Val Leu Arg Ser Pro Gly Leu
 290 295 300

Lys Val Pro Val Phe Tyr Ala Leu Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Asn Leu Ser Thr Ala Glu Glu Val
 325 330 335

Phe Ser His Gly Lys Tyr Met Gln Ser Thr Thr Val Glu Gln Ser His
 340 345 350

Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Lys Pro Arg Pro Gly
 355 360 365

Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
 370 375 380

Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
 385 390 395 400

Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys
 405 410 415

Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp
 420 425 430

Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
 435 440 445

His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr
 450 455 460

Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser
 465 470 475 480

Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
 485 490 495

Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys

500	505	510
Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr		
515	520	525
Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln		
530	535	540
Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser		
545	550	555
Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys		
565	570	575
Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Gly		
580	585	590
Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn		
595	600	605
Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys		
610	615	620
Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala		
625	630	635
Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro		
645	650	655
Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val		
660	665	670
Leu Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Val Gln		
675	680	685
Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr		
690	695	700
Gly Thr Ser Cys Glu Pro Lys Ile Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu		
705	710	715
His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu		
725	730	735

Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe
 740 745 750
 Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg
 755 760 765
 Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp
 770 775 780
 Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser
 785 790 795 800
 Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu
 805 810 815
 Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp
 820 825 830
 Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val
 835 840 845
 Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp
 850 855 860

<210> 4

<211> 4157

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

ctgagccgca tctgcaatag cacacttgcc cggccacctg ctgccgtgag cctttgctgc 60
 tgaagcccct ggggtcgcct ctacctgatg aggatgtgca cccccattag ggggtctgctc 120
 atggcccttg cagtgatgtt tgggacagcg atggcatttg caccataacc ccggatcacc 180
 tgggagcaca gagaggtgca cctggtgcag tttcatgagc cagacatcta caactactca 240
 gccttgctgc tgagcgagga caaggacacc ttgtacatag gtgcccggga ggcggtcttc 300
 gctgtgaacg cactcaacat ctccgagaag cagcatgagg tgtattggaa ggtctcagaa 360
 gacaaaaaag caaaatgtgc agaaaagggg aaatcaaac agacagagtg cctcaactac 420
 atccgggtgc tgcagccact cagcgccact tccctttacg tgtgtgggac caacgcattc 480

cagccggcct gtgaccacct gaacttaaca tcctttaagt ttctggggaa aaatgaagat 540
 ggcaaaggaa gatgtccctt tgaccagca cacagctaca catccgtcat ggttgatgga 600
 gaactttatt cggggacgtc gtataatttt ttgggaagtg aaccatcat ctcccgaat 660
 tcttcccaca gtctctgag gacagaatat gcaatccctt ggctgaacga gcctagtttc 720
 gtgtttgctg acgtgatccg aaaaagccca gacagccccg acggcgagga tgacagggtc 780
 tacttcttct tcacggaggt gtctgtggag tatgagtttg tggtcagggt gctgatccca 840
 cggatagcaa gagtgtgcaa gggggaccag ggcggcctga ggaccttgca gaagaaatgg 900
 acctccttcc tgaaagcccc actcatctgc tcccgccag acagcggctt ggtcttcaat 960
 gtgctgcggg atgtcttctg gctcaggtcc ccgggcctga aggtgcctgt gttctatgca 1020
 ctcttcaccc cacagctgaa caacgtgggg ctgtcggcag tgtgcgcta caacctgtcc 1080
 acagccgagg aggtcttctc ccacgggaag tacatgcaga gcaccacagt ggagcagtcc 1140
 cacaccaagt ggggtgcgta taatggcccc gtaccaagc cgcggcctgg agcgtgcac 1200
 gacagcgagg cacgggccgc caactacacc agctccttga atttgccaga caagacgtg 1260
 cagttcgta aagaccaccc ttgatggat gactcggtaa cccaataga caacaggccc 1320
 aggttaatca agaaagatgt gaactacacc cagatcgttg tggaccggac ccaggccctg 1380
 gatgggactg tctatgatgt catgtttgtc agcacagacc ggggagctct gcacaaagcc 1440
 atcagcctcg agcacgtgt tcacatcatc gaggagaccc agctcttcca ggactttgag 1500
 ccagtccaga cctgtctgt gtcttcaaag aagggaaca ggtttgtcta tgctggctct 1560
 aactcgggcg tggccaggc ccgctggcc ttctgtggga agcacggcac ctgcgaggac 1620
 tgtgtgctgg cgcgggaccc ctactgcgc tggagccgc ccacagcgac ctgcgtggct 1680
 ctgcaccaga ccgagagccc cagcagggt ttgattcagg agatgagcgg cgatgcttct 1740
 gtgtgcccgg ataaaagtaa aggaagtac cggcagcatt tttcaagca cgggtggcaca 1800
 gcggaactga aatgtccca aaaatccaac ctggcccggg tcttttgaa gttccagaat 1860
 ggctgttga aggcgagag cccaagtac ggtcttatgg gcagaaaaa cttgctcatc 1920
 ttcaacttgt cagaaggaga ~~cagtggggtg-taccagtgc-tgtcagaggagagggttaag~~ 1980
 aacaaaacgg tcttccaagt ggtcgccaag cacgtcctgg aagtgaagg ggttccaaag 2040
 ccgtagtg cccccacct gtcagttgt cagacagaag gtagtaggat tgccaccaa 2100
 gtgttggtg catccacca aggtcttct ccccaaccc cagccgtgca ggccacctcc 2160
 tccggggcca tcaccttcc tccaagcct gcgcccacc gcacatcctg cgaaccaaag 2220

atcgtcatca acacgggtccc ccagctccac tcggagaaaa ccatgtatct taagtccagc 2280
 gacaaccgcc tcctcatgtc cctcttcttc ttcttctttg ttctcttctt ctgcctcttt 2340
 ttctacaact gctataaggg atacctgccc agacagtgtc tgaaattccg ctcggcccta 2400
 ctaattggga agaagaagcc caagtcagat ttctgtgacc gtgagcagag cctgaaggag 2460
 acgttagtag agccaggag cttctcccag cagaatgggg agcaccctaa gccagccctg 2520
 gacaccggct atgagaccga gcaagacacc atcaccagca aagtccccac ggatagggag 2580
 gactcacaga ggatcgacga cttttctgcc agggacaagc ctttgacgt caagtgtgag 2640
 ctgaagttag ctgactcaga cgcagatgga gactgaggcc ggctgtgcat ccccgctggg 2700
 gcctcggctg cgacgtgtcc aggcgtggag agtttttgtt ttctcctgtt cagtatccga 2760
 gtctcgtgca gtgctgcgta ggtagcccg catcgtgcag acaacctcag tcctcttgtc 2820
 tattttctct tgggttgagc ctgtgacttg gtttctcttt gtccttttgg aaaaatgaca 2880
 agcattgcat cccagtcttg tgttccgaag tcagtcggag tacttgaaga aggccacagg 2940
 gcggcacgga gttcctgagc cttttctgta gtgggggaaa ggtggctgga cctctgttgg 3000
 ctgagaagag catcccttca gttcccttc cccgtagcag ccactaaaag attatttaat 3060
 tccagattgg aaatgacatt ttagttatc agattggtta cttatcgctt gttgtccaga 3120
 ttggcacgaa ctttttcttc cacttaatta ttttttagg attttgcttt gattgtgttt 3180
 atgtcatggg tcattttttt ttagttacag aagcagttgt gttaatattt agaagaagat 3240
 gtatatcttc cagattttgt tatatatatt gcataaaata cggcttacgt tgcttaagat 3300
 tctcagggat aaacttctt ttgctaaatg cattctttct gcttttagaa atgtagacat 3360
 aaacactccc cggagccac tcacctttt tcttttctt ttttttttt taactttatt 3420
 ccttgaggga agcattgttt ttggagagat tttctttctg tacttcgttt tacttttctt 3480
 ttttttaac ttttactctc tcgaagaaga ggaccttccc acatccacga ggtgggtttt 3540
 gagcaaggga aggtagcctg gatgagctga gtggagccag gctggcccag agctgagatg 3600
 ggagtgcggt acaatctgga gccacagct gtcggtcaga acctcctgtg agacagatgg 3660
 aaccttcaca agggcgcctt tggttctctg aacatctctt ttctcttctt gcttcaattg 3720
 cttaaccaact gcctgcccag actttctatc cagcctcact gagctgcca ctactggaag 3780
 ggaactgggc ctcggtggcc ggggccgca gctgtgacca cagcaccctc aagcatacgg 3840
 cgctgttctt gccactgtcc tgaagatgtg aatgggtggg acgatttcaa cactggttaa 3900
 ttccacactc catctccccg ctttgtaa atccatcggg aagagacttt tttccatgg 3960

tgaagagcaa taaactctgg atgtttgtgc gcgtgtgtgg acagtcttat cttccagcat 4020
gataggattt gaccattttg gtgtaaacad ttgtgtttta taagattttac cttgttttta 4080
tttttctact ttgaattgta tacatttgga aagtacccaa ataaatgaga agcttctatc 4140
cttaaaaaaa aaaaaaa 4157

<210> 5

<211> 361

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 5

Met Ala Asp Ala Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Arg Phe Val Lys Val Pro
5 10 15
Leu Lys Asn Ser Ala Ser Asn His Leu Gly Gln Asp Cys Glu Ala Tyr
20 25 30
Glu Asp Gly Glu Leu Thr Tyr Glu Asn Val Gln Val Ser Pro Val Pro
35 40 45
Gly Gly Pro Pro Gly Leu Ala Ser Pro Ala Leu Ala Asp Lys Ala Gly
50 55 60
Val Gly Ser Glu Gln Pro Thr Ala Thr Trp Ser Ser Val Asn Ser Ser
65 70 75 80
Ala Leu Arg Gln Ile Pro Arg Cys Pro Thr Val Cys Leu Gln Tyr Phe
85 90 95
Leu Leu Gly Leu Leu Val Ser Cys Leu Met Leu Gly Val Ala Val Ile
100 105 110
Cys Leu Gly Val Arg Tyr Leu Gln Val Ser Arg Gln Phe Gln Glu Gly
115 120 125
Thr Arg Ile Trp Glu Ala Thr Asn Ser Ser Leu Gln Gln Gln Leu Arg
130 135 140
Glu Lys Ile Ser Gln Leu Gly Gln Lys Glu Val Glu Leu Gln Lys Ala
145 150 155 160

Arg Lys Glu Leu Ile Ser Ser Gln Asp Thr Leu Gln Glu Lys Gln Arg			
165	170	175	
Thr His Glu Asp Ala Glu Gln Gln Leu Gln Ala Cys Gln Ala Glu Arg			
180	185	190	
Ala Lys Thr Lys Glu Asn Leu Lys Thr Glu Glu Glu Arg Arg Arg Asp			
195	200	205	
Leu Asp Gln Arg Leu Thr Ser Thr Arg Glu Thr Leu Arg Arg Phe Phe			
210	215	220	
Ser Asp Ser Ser Asp Thr Cys Cys Pro Cys Gly Trp Ile Pro Tyr Gln			
225	230	235	240
Glu Arg Cys Phe Tyr Ile Ser His Thr Leu Gly Ser Leu Glu Glu Ser			
245	250	255	
Gln Lys Tyr Cys Thr Ser Leu Ser Ser Lys Leu Ala Ala Phe Asp Glu			
260	265	270	
Pro Ser Lys Tyr Tyr Tyr Glu Tyr Leu Ser Asp Ala Pro Gln Val Ser			
275	280	285	
Leu Pro Ser Gly Leu Glu Glu Leu Leu Asp Arg Ser Lys Ser Tyr Trp			
290	295	300	
Ile Gln Met Ser Lys Lys Trp Arg Gln Asp Ser Asp Ser Gln Ser Arg			
305	310	315	320
His Cys Val Arg Ile Lys Thr Tyr Tyr Gln Lys Trp Glu Arg Thr Ile			
325	330	335	
Ser Lys Cys Ala Glu Leu His Pro Cys Ile Cys Glu Ser Glu Ala Phe			
340	345	350	
Arg Phe Pro Asp Gly Ile Asn Leu Asn			
355	360		

<210> 6

<211> 1357

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 6

tggaagactg tgaagcagag gcgcccaggg ctatggctga cgctatcacg tatgcagacc 60
tgcgctttgt gaaagtgtcc ctgaagaaca gcgcatctaa ccatctagga caggactgtg 120
aggcctatga agatggggaa ctcacctacg agaatgtgca agtgtctcca gtcccaggag 180
ggccaccagg cttggcttcc cctgcactag cggacaaagc aggggtcggg tcagagcaac 240
caactgcgac ctggagctct gtgaactcgt ctgctctcag gcagattccc cgctgtccta 300
cagtctgctt gcaatacttc ttgcttggcc ttctcgtgtc ctgtctgatg ttaggggtgg 360
ctgtcatctg cctgggagtt cgctatctgc aggtgtctcg gcagttccag gaggggacca 420
ggatttggga agccaccaat agcagcctgc agcagcagct cagggagaag ataagtcagc 480
tggggcagaa ggaggtggag cttcagaagg ctcggaagaa gctgatctcg agccaggaca 540
cattacagga gaagcagagg actcacgagg acgctgagca gcaactacaa gcctgccagg 600
ctgagagagc gaagaccaag gagaacctga aaactgagga ggagcggagg agggacctgg 660
accagagggt gacaagcacg cgggagacac tgaggcgctt cttctctgat tcatcagaca 720
cctgctgtcc atgcggatgg attccatata aggaaagggtg cttttacatc tcacataccc 780
tcggaagtct ggaggagagc caaaaatact gcacatctct gtcctccaaa ctggcagcat 840
tcgatgaacc ttctaagtat tactatgaag tttctctgcc cagcggctta gaggagtgtc 900
tagatcggtc gaagtcatat tggatacaga tgagcaagaa gtggaggcag gactctgact 960
ctcaaagccg acattgtgtc aggataaaaa catattacca gaagtgggaa agaacaattt 1020
ccaagtgtgc agagcttcac ccctgcattt gtgagtcgga ggctttcagg tttcctgatg 1080
ggatcaatct gaactgaaac ggacacttga acaagacctt gtgacctaca tccttaacct 1140
acggcctgcc aatttttaag actgctattc ctccagcact ccctcactct cgggcatgcc 1200
cagctaaggg atgacctgct gcttgcttga aagctgctcc agaaactgga cttctcttgg 1260
gaagagtaaa gaagcctcca gaaaagactt gaccttcctt aagaacttcc caaactagag 1340
atgggtcagg ggagggc 1357

<210> 7

<211> 359

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asp	Leu	Arg	Phe	Val	Lys	Ala	Pro
				5					10					15	
Leu	Lys	Lys	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Leu	Gly	Gln	Asp	Pro	Gly	Ala	Asp
			20					25					30		
Asp	Asp	Gly	Glu	Ile	Thr	Tyr	Glu	Asn	Val	Gln	Val	Pro	Ala	Val	Leu
		35					40						45		
Gly	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Ser	Val	Leu	Gly	Asp	Lys	Ala	Ala
	50					55					60				
Val	Lys	Ser	Glu	Gln	Pro	Thr	Ala	Ser	Trp	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Pro
	65				70					75				80	
Ala	Val	Gly	Arg	Ile	Leu	Pro	Cys	Arg	Thr	Thr	Cys	Leu	Arg	Tyr	Leu
			85					90					95		
Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Val	Thr	Ala	Ile
		100						105					110		
Cys	Leu	Gly	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln	Val	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Gln	Thr
		115						120					125		
Asn	Arg	Val	Leu	Glu	Val	Thr	Asn	Ser	Ser	Leu	Arg	Gln	Gln	Leu	Arg
		130						135					140		
Leu	Lys	Ile	Thr	Gln	Leu	Gly	Gln	Ser	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Gly	Ser
	145				150					155				160	
Arg	Arg	Glu	Leu	Ala	Gln	Ser	Gln	Glu	Ala	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Arg
			165					170					175		
Ala	His	Gln	Ala	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Ala	Cys	Gln	Ala	Asp	Arg
		180						185					190		
Gln	Lys	Thr	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Arg	Arg	Ala
		195						200					205		
Leu	Glu	Gln	Lys	Leu	Ser	Asn	Met	Glu	Asn	Arg	Leu	Lys	Pro	Phe	Phe
	210							215					220		

Thr Cys Gly Ser Ala Asp Thr Cys Cys Pro Ser Gly Trp Ile Met His
 225 230 235 240
 Gln Lys Ser Cys Phe Tyr Ile Ser Leu Thr Ser Lys Asn Trp Gln Glu
 245 250 255
 Ser Gln Lys Gln Cys Glu Thr Leu Ser Ser Lys Leu Ala Thr Phe Ser
 260 265 270
 Glu Ile Tyr Pro Gln Ser His Ser Tyr Tyr Phe Leu Asn Ser Leu Leu
 275 280 285
 Pro Asn Gly Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Trp Thr Gly Leu Ser Ser Asn
 290 295 300
 Lys Asp Trp Lys Leu Thr Asp Asp Thr Gln Arg Thr Arg Thr Tyr Ala
 305 310 315 320
 Gln Ser Ser Lys Cys Asn Lys Val His Lys Thr Trp Ser Trp Trp Thr
 325 330 335
 Leu Glu Ser Glu Ser Cys Arg Ser Ser Leu Pro Tyr Ile Cys Glu Met
 340 345 350
 Thr Ala Phe Arg Phe Pro Asp
 355 359

<210> 8

<211> 1531

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

agtcacagag ggaacacaga gcctagtgt aaacggacag agacgagagg tggcaaggag 60
 gacagtggat gacaggggaag acgagtgggg gacagagctgc ttaggaccat tggctgagge 120
 atcacctatg cagatctgag gtttgtgaag gctcccciga agaagagcat ctccagccgg 180
 ttaggacagg acccaggggc tgatgatgat ggggaaatca cctacgagaa tgttcaagt 240
 cccgcagtcc taggggtgcc ctcaagcttg gcttcttctg tactagggga caaagcagcg 300
 gtcaagtcgg agcagccaac tgcgtcctgg agagccgtga cgtcaccagc tgtcgggcgg 360

attctccct gccgcacaac ctgcctgcga tacctcctgc tcggcctgct cctcacctgc 420
 ctgctgttag gaggaccgc catctgcctg ggagtgcgct atctgcaggt gtctcagcag 480
 ctccagcaga cgaacagggt tctggaagtc actaacagca gcctgaggca gcagctccgc 540
 ctcaagataa cgcagctggg acagagtgcg gaggatctgc aggggtccag gagagagctg 600
 gcgcagagtc aggaagcact acaggtggaa cagagggctc atcaggcggc cgaaggcgag 660
 ctacaggcct gccaggcaga cagacagaag acgaaggaga ccttgcaaag tgaggagcaa 720
 cagaggaggg ccttgagcga gaagctgagc aacatggaga acagactgaa gcccttcttc 780
 acatgcggct cagcagacac ctgctgtccg tcgggatgga taatgcatca gaaaagctgc 840
 ttttacatct cacttacttc aaaaaattgg caggagagcc aaaaacaatg tgaaactctg 900
 tcttccaagc tggccacatt cagtgaatt tatccacaat cacactctta ctacttctta 960
 aattcactgt tgccaaatgg tggttcaggg aattcatatt ggactggcct cagctctaac 1020
 aaggattgga agttgactga tgatacaca cgcactagga cttatgctca aagctcaaaa 1080
 tgtaacaagg tacataaaac ttggtcatgg tggacactgg agtcagagtc atgtagaagt 1140
 tctcttccct acatctgtga gatgacagct ttcaggtttc cagattagga cagtcctttg 1200
 cactgagttg acactcatgc caacaagaac ctgtgcccct ccttcctaac ctgaggcctg 1260
 gggttcctca gaccatctcc ttcattctgg gcagtgccag ccaccggctg acccacacct 1320
 gacacttcca gccagtctgc tgcctgctcc ctcttctga aactggactg ttcctgggaa 1380
 aagggtgaag ccacctctag aagggaactt ggcctcccc caagaacttc ccatggtaga 1440
 atgggggtggg ggaggagggc gcacgggctg agcggatagg ggcgggcccg agccagccag 1500
 gcagttttat tgaaatcttt ttaaataatt g 1531

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 9

gctgtcgact gtgtgcccgt tgctgaaggc ct

32

<210> 10

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

gacggatcct acttactttg ctttgcttgc ttgagataca ccgtcttctc tga 53

【 0 0 5 1 】

【図面の簡単な説明】

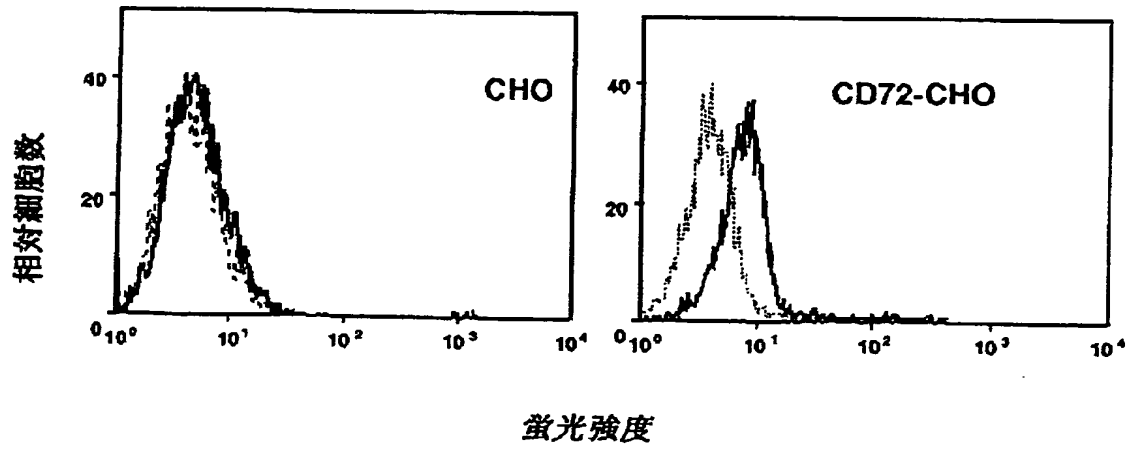
【図 1】 実施例 1 中、CD 7 2 発現 CHO 細胞と mCD 1 0 0 - F c との結合性を示す。

【図 2】 実施例 2 中 CD 1 0 0 の I g G 1 特異的抗体産生促進活性を示す。

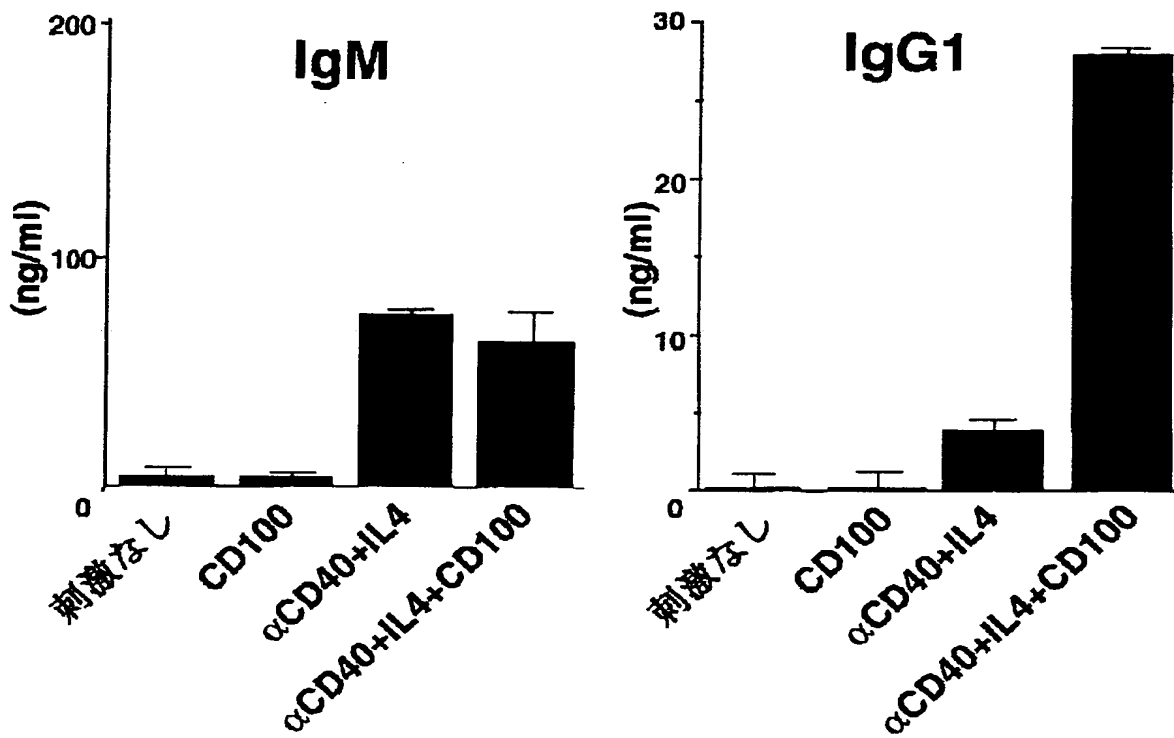
【図 3】 実施例 3 中の生体内における CD 1 0 0 の抗体産生誘導促進活性について示す。

【書類名】 図面

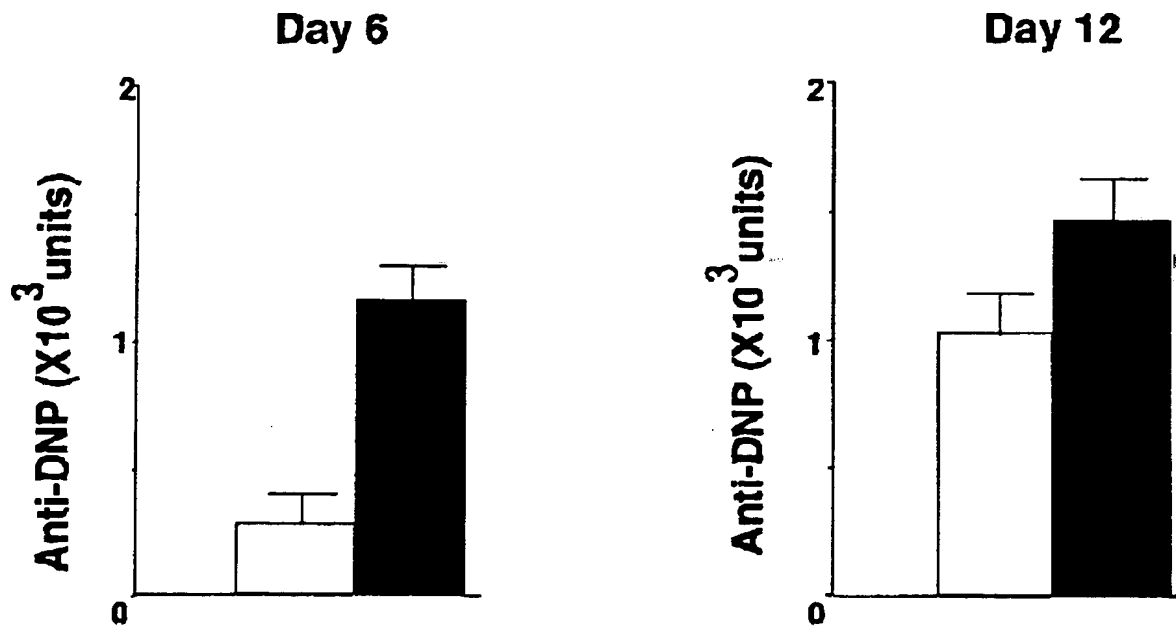
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れたスクリーニング法の提供。

【解決手段】 CD100またはその塩をリガンドとして用いることを特徴とする、CD100またはその塩とその受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング法。

【効果】 ウイルスによる感染症または疾病、細菌または真菌による感染症または疾病、癌などの予防・治療薬などとして用いることができるCD72アゴニスト、または異常抗体産生または過度の抗体産生によってもたらされる疾病などの予防・治療薬などとして用いることができるCD72アンタゴニストのスクリーニング方法として有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日	1992年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名	武田薬品工業株式会社